

ÜBER DIE IMMUNOLOGISCHE
INSULINRESISTENZ UND IHRE
AUSWIRKUNG AUF DIE
INSULINTHERAPIE

Hannelore Tyrolter

1972

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

ÜBER DIE IMMUNOLOGISCHE INSULINRESISTENZ UND IHRE
AUSWIRKUNG AUF DIE INSULINTHERAPIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilian - Universität zu München

vorgelegt von
HANNELORE TYROLLER
Ried
München 1971



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Seitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.1972



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
II. Besprechung des vorliegenden Schrifttums	6
III. Patientengut und Methodik	17
IV. Ergebnisse	26
V. Diskussion der Ergebnisse	32
VI. Zusammenfassung	36
VII. Literaturverzeichnis	37
VIII. Lebenslauf	44

I. Einleitung

Bei der Insulinbehandlung von Diabetikern kommt es nach zwei bis sechs Wochen in den meisten Fällen zur Bildung von insulinbindenden Antikörpern (18,50,56,58). Bei fast der Hälfte aller Diabetiker reicht die tägliche Insulinmenge von 40 Einheiten nicht aus. Einer der Gründe hierfür ist die Inaktivierung eines Teils des Hormons durch Insulinantikörper.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Größe der maximalen Insulinbindungskapazität und Beziehungen der maximalen Insulinbindungskapazität zum täglichen Insulinbedarf und zur Dauer der Insulintherapie an 225 insulinspritzenden Diabetikern untersucht werden.

Um methodische Fehler auszuschalten, die bei der graphischen Auswertung der Meßpunkte (56,58,18) durch eine oft willkürliche Extrapolation entstehen, wird ein mathematisches Verfahren angewandt.

II. Literaturübersicht

Insulin als Antigen

Hansen und Eyer (1), Schirren und Sauer (2) konnten finden, daß der allergisierende Effekt des Insulins durch verschiedene Zusätze, wie z.B. durch Stabilisatoren, Desinfizienzen oder Depotkörper hervorgerufen werden kann. Nach Umsetzen auf höher gereinigte Präparate konnten die Autoren schwere allergische Zustände erheblich bessern.

1928 konnte Tuft (3) zeigen, daß ein Patient mit allergischen Hauterscheinungen gegenüber Rohinsulin ebenso allergische Hautreaktionen gegenüber mehrfach umkristallisierten Insulin aufwies, aber nicht gegen das Gewebseiweiß des Tieres, von dem das Insulin stammte.

Die Beigabe sog. Verzögerungssubstanzen oder Adjuvantien ist ebensowenig erforderlich, um Insulin als Antigen wirken zu lassen, wie die als unphysiologisch angesehene subcutane Injektion.

So berichtet Morcos (4) über die Ursache der Insulinresistenz bei der Insulinschocktherapie in der Psychiatrie:

" Die Untersuchungen ergaben, daß bei allen Kranken im Serum insulinbindende und insulinneutralisierende Eigenschaften vorlagen. Diese Eigenschaften werden auf Insulinantikörper zurückgeführt und die Ursache der Insulinresistenz in einem immunologischen Mechanismus gesehen. Das besagt, daß bei der Bildung von Antikörpern gegen spezieisdifferentes Insulin die den üblichen Depotinsulinen der Diabetestherapie zugesetzten Verzögerungssubstanzen keine oder nur eine gewisse Rolle spielen, da bei den psychisch Kranken ausschließlich kristallines Insulin injiziert worden war."

Ähnliche Beobachtungen machten Banting, Franks und Gairns (5)

bei einem psychiatrischen Kranken, der längere Zeit der Schockbehandlung mit Insulin unterworfen war. Sie wiesen die insulinneutralisierende Wirkung des Serums des Patienten mit Hilfe des Mäusekrampf testes nach und lokalisierten den insulinantagonistischen Faktor bei den Serumglobulinen.

Es gilt heute als gesichert, daß das Insulin, trotz seiner relativen geringen Molekülgröße (MG 6000 des Monomers) als selbständiges Antigen in Betracht kommt.

Mehreren Autoren gelang es, durch Injektion von Anti-insulinseren bei Tieren einen akuten Diabetes zu erzeugen. Die histologische Untersuchung zeigte an den B-Zellen des Inselorgans typische Veränderungen mit Degranulierung infolge erschöpfter Insulinproduktion bei Infiltration von neutrophilen und eosinophilen Zellen sowie Monózyten in die Umgebung als Ausdruck lokalen Eingreifens der zugeführten Insulinantikörper (6,7,8).

Brunfeldt und Deckert (9) konnten auch mit höchstgereinigtem Schweineinsulin bei Kaninchen zirkulierende Insulinantikörper hervorrufen. In letzterer Zeit konnte man nachweisen, daß auch teil- und vollsynthetisches Insulin in seiner biologischen Wirkung durch Insulinantikörper hemmbar ist (10).

Die Insulinallergie

Die Insulinallergie wird heute eingeteilt in

- a) die allergische Reaktion vom Sofort-Typ mit maximaler urticarieller Reaktion an der Einstichstelle oder generalisierten Erscheinungen nach 10 bis 15 Minuten. Der Nachweis zirkulierender Reagine, d.h. thermolabiler, elektrophoretisch mit den Beta- und Gammaglobulinen wanderender Substanzen vom Antikörpercharakter ist im Prausnitz-Küstner-Versuch positiv.

- b) die allergische Reaktion vom verzögerten Typ mit lokaler Rötung und Infiltration maximal 24 bis 72 Stunden nach der Injektion, der Prausnitz-Küstner-Versuch bleibt negativ. Diese Reaktion wird durch zellständige Antikörper ausgelöst(11).

Kerp (12) fand den Leukozytenextrakt einer Patientin mit ausgeprägter verzögerter Insulinallergie vermehrt insulinbindend und schloß auf antikörperhaltige Strukturen an den Granulozyten bzw. Lymphozyten. Über entsprechende Befunde berichten Federlin und Mitarbeiter (13), die eine gesteigerte Fixation von Fluoresceinisothyocyanat-insulin an Lymphozyten, weniger auch an Granulozyten sahen. Nach Wechsel des Insulins und Rückgang der cutanen Erscheinungen nahm auch die Zahl der fluoreszierenden Leukozyten ab. Bei Insulinallergien vom Sofort-Typ haben Berson u.a. (14, 15, 16) im Blut zirkulierende Insulinantikörper nachgewiesen, und zwar vom I_{gA} - und I_{gM} -Typ. Aus der Sofort-Allergie kann sich unmittelbar eine akute Insulinresistenz mit zirkulierenden, insulinneutralisierenden Antikörpern entwickeln (17, 12).

Immunologische Reaktionsabläufe nach Insulininjektion (18):

Reaktionsmechanismus Klinische Erscheinung Nachweis

lokale Entzündung vom "Tuberkulin-Typ" (Ansammlung von mononukleären Zellen)	lokale Schwellung und Rötung am Ort der Insulininjektion nach mehreren Stunden	Übertragung durch Zellen?
humorale Antikörper vom "Reagin-Typ" (Gamma A-Gamma M-Globuline)	Urticaria, Quincke-Ödem, anaphylaktische Reaktion.	Prausnitz-Küstner
humorale Antikörper (Gamma-G-Globuline)	Abschwächung der biologischen Insulinwirkung	Neutralisationstest

Die antigenen Determinanten des Insulins

Erst die Aufklärung der Primärstruktur der Insulinmoleküle verschiedener Spezies schien den wissenschaftlich überzeugenden Schlüssel zur Klärung der Antikörperbildung gegen das gereinigte, kleinmolekulare Proteohormon zu bieten. Die meisten Säugetierinsuline unterscheiden sich durch verschiedene Aminosäuren in Position acht bis zehn der A-Kette, gelegentlich hinsichtlich der terminalen Aminosäure 30 der B-Kette. Insuline, die sich nur hinsichtlich einer Aminosäure der A-Kette unterscheiden, z.B. die Insuline vom Rind und Schaf, wirken in der komplementären Spezies weniger stark antigen, als bei der Kombination von Tieren mit stärkeren Differenzen in der Aminosäuresequenz (z.B. Rind und Schwein).

Berson und Yalow (19) zeigten, daß die insulinbindenden Antikörper im Serum mit Rinder-Schweine-Mischinsulin behandelten Patienten oft, aber keineswegs immer zwischen verschiedenen Insulinen immunologisch "unterscheiden" konnten. So wurde das dem Humaninsulin strukturell ferner stehende Rinder- und Schafinsulin stärker gebunden, als das weniger differente Schweine- und Pferdeinsulin. Die geringste Bindung zeigte das Humaninsulin selbst. Beweise für die antigene Eigenschaft der A-Kette lieferten Wilson, Dixon und Wardlaw (20). Sie stellten Hybridinsulin her aus den getrennten A- und B-Ketten vom Rind und Fisch. Kabeljau-A-Kette und Rinder-B-Kette, sowie reines Kabeljauinsulin reagierten nur schwach mit dem Meerschweinchen-Antikörper gegen Rinderinsulin. Dagegen reagierte die Rinder-A-Kette und die Kabeljau-B-Kette genauso wie Rinderinsulin. In früheren Experimenten (19) reagierten hochgereinigte A- und B-Ketten nicht mit Insulinantikörpern. Änderungen der Konformation, wie

auch die Veränderung der Aminosäuren können der Grund dafür gewesen sein.

Berson (21) besorgte native A-Ketten mit einer intakten Intradisulfidbrücke. Diese Verbindung hemmt die Reaktion des J-131-Insulins mit dem Antikörper. Es waren nur noch zwei bis drei% der Aktivität eines intakten Moleküls vorhanden. Vielleicht lag eine Verunreinigung mit Insulin vor.

Ein anderer potentiell antigener Bereich ist der C-Terminus der B-Kette. An dieser Stelle befindet sich beim Menschen als endständige Aminosäure Threonin, wohingegen die therapeutisch verwendeten Tierinsuline in dieser Position Alanin aufweisen.

Änderungen der Aminosäuresequenz ziehen aber nicht nur immunologische Konsequenzen nach sich, es ändert sich auch die biologische Aktivität. So hat beispielsweise desoctopeptiertes (=DOP) Rinderinsulin (die acht C-terminalen Aminosäuren fehlen) tatsächlich eine geringere biologische Aktivität als intaktes Rinderinsulin. (22,23).

Lockwood und Prout (24) entfernten das Alanin des Schweineinsulins, das Serin des Kanincheninsulins und das Threonin des menschlichen Insulins. Die Insuline der drei Spezies mußten nunmehr völlig identisch reagieren. Trotzdem ließ sich beim Menschen, Schweinen und Kaninchen zeigen, daß auch diese derart verkürzten und nach der Primärstruktur gleichartigen Insuline, die den terminal veränderten endogenen Insulinen der drei Spezies analog sein mußten, bei allem drei Spezies Antikörperbildung hervorriefen.

Sie hatten damit echte Antigenität und nicht nur immunologische Reaktivität gezeigt. Auch andere Arbeitskreise fanden die Bildung von Antikörpern gegen homologes Insulin: so Renold und Mitarbeiter bei Kühen (25), Brunfeldt und Deckert (9) bei Schweinen, Kerp und Mitarbeiter (26) beim

Hammel und vor längerer Zeit schon Fenton und Mitarbeiter (26) beim Meerschweinchen. Lowell (27) beobachtete 1942 bei einer insulinresistenten Diabetikerin eine generalisierte Urticaria vom Sofort-Typ nach Humaninsulin, andererseits zeigte Rinder-Schweine-Mischinsulin einen guten hypoglykämisierenden Effekt.

Bemerkenswerterweise sind weder die A-Kette noch die B-Kette allein in der Lage, die Bindung von Insulin an seinen Antikörper zu hemmen (19).

Die gegen die einzelnen Ketten und gegen Gesamtinsulin erzeugten Antikörper differieren deutlich in ihrer immunologischen Reaktivität, sie müssen sich gegen verschiedene Antigenkomponenten richten (28).

Die letzten sieben Aminosäuren der C-Terminals der B-Kette sind im Übrigen zwar notwendig für die biologische Aktivität, jedoch nicht für die Bindung des Antikörpers an das Insulinmolekül (29). Biologisch aktive Insuline können darüber hinaus durch inaktiviertes Hormon von der Antikörperbindung verdrängt werden (30). Es dürfte also nicht an der Primärstruktur der tierischen Insuline liegen, wenn sie vom menschlichen Abwehrsystem als fremd empfunden werden. Vielleicht sind Sekundär- oder Tertiärstrukturen von Plasmainsulin und Pankreashormon von vorneherein nicht identisch. Dafür spricht, daß das Pankreashormon bei seiner Leberpassage an Transportproteine gekoppelt wird und Komplexbildungen seine antigenen Determinanten abschirmen (31).

Die Insulinantikörper

Die gegen Insulin gebildeten Antikörper konnten mit Hilfe verschiedener Reaktionen nachgewiesen werden.

I. Durch allergische Reaktionen, wie die direkte anaphylaktische Hautreaktion (3), die Prausnitz-Küstner-Re-

aktion, das Schultz-Dale-Phänomen (32) und die passive Anaphylaxie (33,34).

II. Durch die klassische serologische Reaktion, wie die Präcipitationsreaktion (27,35,36), die Komplementfixationsreaktion (37,38) und die Hämagglutinationsreaktion (39,40,41).

III. Biologisch konnten Insulinantikörper durch Neutralisierung der Hormonwirkung des Insulins nachgewiesen werden (5,8).

Berson und Yalow (42) wiesen 1956 als erste durch in vivo und in vitro Versuche mit J-131-Insulin nach, daß bei nahezu allen insulinbehandelten Personen insulinbindende Antikörper auftreten. Entsprechende Beobachtungen machten Welsh und Mitarbeiter (43), sowie Morse (44).

Bei der Vielzahl der verwandten Reaktionen ist es nicht verwunderlich, daß die Frage der Identität dieser auf so verschiedene Weise demonstrierten Antikörper bis heute diskutiert wird. Der für die allergischen Hautreaktionen verantwortliche Antikörper zeigte keinerlei Beziehung zum Insulinbedarf (45,46). Dies wies bereits darauf hin, daß für die Insulinresistenz einerseits und für die Insulinallergie andererseits möglicherweise verschiedene Antikörper verantwortlich sein könnten.

Berson und Yalow u.a. (42,47,48,44) konnten papierelektrophoretisch nachweisen, daß die Insulinantikörper Gammaglobuline sind, da das mit J-131-markierte Insulin im antikörperhaltigen Serum mit der Fraktion der Gammaglobuline wandert, während es im Normalserum an der Auftragsstelle liegen blieb.

Beim Menschen kommen nach der heutigen Auffassung drei Gammaglobulinfraktionen als Träger spezifischer Insulinantikörper in Betracht: das I_gA (I_g = Immunglobulin), das I_gM

und vor allem das I_gG (14,49).

Bei Insulinallergie wurden Insulinantikörper in der I_gA -Fraktion nachgewiesen (14,15,16).

Klinisch besonders wichtig sind die insulinbindenden und -neutralisierenden, thermostabilen Antikörper der I_gG -Fraktion, die zu verminderter Insulinansprechbarkeit oder zur Insulinresistenz führen (50).

Die klinische Beobachtung, daß bei immunologisch bedingter Insulinresistenz die verminderte Insulinansprechbarkeit plötzlich nachlassen und eine Hypoglykämie auftreten kann (51), spricht dafür, daß die Antigen-Antikörperbindung reversibel ist: das zugeführte Fremdinsulin ist nur so lange inaktiv, wie es an den Antikörper gebunden ist.

Physikalisch-chemische Grundlagen der Insulinbindung an den neutralisierenden Antikörper

Die Gesetzmäßigkeit der Bindung des Insulins an den Antikörper wurde zuerst von Berson und Yalow untersucht (52,21). Sie wendeten die physikalisch-chemischen Grundlagen der Antigen-Antikörperreaktion an.

Der Gebrauch eines markierten Antigens und eines Systems, wodurch das freie Antigen vom löslichen Antigen-Antikörper-Komplex getrennt werden kann, erlaubt ein Studium der Reaktion bei Konzentrationen bis zu 10^{-10} M/l und noch niedrigeren Konzentrationen.

Früher wurde für alle Antigen-Antikörperreaktionen eine Gleichgewichtskonstante von 1 bis 5×10^5 angenommen. Die Gleichgewichtskonstante für den Insulinantikörper beträgt dagegen 10^9 bis 10^{10} . Die Standardänderung der freien Energie beträgt demnach -14 Kcal/Mol, d.h. sie ist zweimal höher, als man früher annahm.

Nach dem der metabolische Abbau des Insulins ohne Antikörper

im Durchschnitt 0,03%/sec beträgt, ist es offensichtlich, daß das meiste Insulin vor dem Abbau an den Antikörper gebunden wird. Da Insulin im Antikörper-Komplex nicht enzymatisch abgebaut werden kann, bleibt es länger im Organismus, als ohne Antikörper (21). Die Formation des Antigen-Antikörperkomplexes hemmt nicht nur die transkapilläre Passage in das Gewebe. Antikörpergebundenes Insulin kann auch extrakapillär nicht mit einer Zelle reagieren. In vitro dissoziieren die Komplexe sehr langsam, daher schreibt man dem Antigen-Antikörper-Komplex eine Depotwirkung zu (21).

Die Charakteristika des Antigen-Antikörper-Komplexes sind sowohl von der Spezies des Antigenspenders als auch des Antigenempfängers abhängig. Tatsächlich scheinen die meisten Fälle chronischer Insulinresistenz immunologischen Ursprungs zu sein. Wenn auch die Präzipitation der Insulinantikörper selten ist, so wurde sie doch, auch bei hoher Antikörperkonzentration beobachtet (21). Studien über die Sedimentationsgeschwindigkeit der Komplexe mit markierten Antikörpern zeigten, daß der Komplex nur ein einziges Antikörpermolekül enthielt. Daraus folgerte Berson und Yalow (21) daß sich das Insulin verhält, als wäre es univalent. Das schließt nicht aus, daß das menschliche Insulin viele immunologisch aktive Stellen hat, aber es besteht die Möglichkeit, daß das relativ kleine Insulinmolekül nur einen einzigen Antikörper zu binden vermag (21).

Der insulinneutralisierende Antikörper hat in der Regel zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Assoziationskonstanten und verschiedenen Bindungsenergien (12,53,54,55).

Setzt man einem insulinbindenden Serum bei konstanter Antikörperkonzentration Insulin in steigenden Mengen zu, so geht der prozentuale Anteil des gebundenen Insulins zurück. Die gebundenen absoluten Insulinmengen steigen dabei jedoch an, ihre Kurve strebt dem Punkt der maximalen Bindungskapazität des Serums zu. Bei Übertragung der Meßwerte

auf das von Berson und Yalow (56) für die Insulinantikörperbestimmung eingeführte Koordinatensystem nach Scatchard (57) mit der Ordinate $[\text{Insulin}_{\text{gebunden}}]/[\text{Insulin}_{\text{frei}}]$, und der Abszisse $[\text{Insulin}_{\text{gebunden}}]$ ergibt sich eine hyperbelähnliche Kurve, die auf die Existenz zweier verschiedener Insulinbindungsstellen Ak_1 und Ak_2 hinweist (56,50,58). Aus dem Verlauf dieser Extrapolationskurve lassen sich die Konzentrationen der beiden Insulinbindungsstellen Ak_1 und Ak_2 und ihre Assoziationskonstanten k_1 und k_2 ermitteln. Die Assoziationskonstanten für k_1 und k_2 können aus den Schnittpunkten der Asymptoten mit der Ordinate bestimmt werden (50,56,58).

Die maximale Konzentration an Insulinbindungsstellen eines Antiinsulinserums ergibt sich unter Berücksichtigung der Serumverdünnung aus dem Abszissenschnittpunkt der Extrapolationskurve (50).

Die beiden Antikörperbindungsstellen Ak_1 und Ak_2 unterscheiden sich hinsichtlich der Festigkeit der mit dem Insulin gebildeten Komplexe und ihren Konzentrationen stark voneinander. Insulin wird an die Bindungsstelle Ak_1 mit einer etwa um zwei Zehnerpotenzen höheren Assoziationskonstante gebunden. Daher überwiegt bei der Mehrzahl der Patientenserum im Bereich niedriger Seruminsulinkonzentrationen die Insulinbindung an Ak_1 . Ak_2 kann sich erst bei relativ hohen Seruminsulinkonzentrationen wesentlich an der Insulinbindung beteiligen. Daher lassen sich auch für Ak_1 und Ak_2 charakteristische Beziehungen zum Insulinbedarf nachweisen (58). Mit Zunahme von Ak_1 steigt der Insulinbedarf an, bei Ak_2 ebenso, nur viel schwächer. Auch für die Summe von Ak_1 und Ak_2 , also für die maximale Bindungskapazität ergab sich eine Korrelation zum täglichen Insulinbedarf (58).

Eigene Fragestellungen:

Für unsere Untersuchungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Wie können grobe Fehler bei der graphischen Ermittlung der maximalen Insulinbindungskapazität vermieden werden?
- 2) Besteht eine Korrelation zwischen maximaler Insulinbindungskapazität und täglichem Insulinbedarf?
- 3) Welche Beziehung hat die maximale Insulinbindungskapazität zu den beiden Antikörperbindungsstellen Ak_1 und Ak_2 ?
- 4) Besteht eine Beziehung der maximalen Insulinbindungskapazität zur Dauer der Insulintherapie?

III. Patientengut und Methodik

Das Krankengut bestand aus diabetischen Patienten der III. Medizinischen Abteilung des Schwabinger Krankenhauses. Untersucht wurden solche Patienten, die mindestens ein halbes Jahr lang insulinbedürftig waren. Der Insulinbedarf lag am häufigsten zwischen 36 und 60 Einheiten täglich

An 225 Diabetikern wurde die maximale Insulinbindungskapazität untersucht. Zur Kontrolle wurden außerdem 27 stoffwechselgesunde Personen untersucht.

Bestimmung der maximalen Insulinbindungskapazität des Serums

Die Methode wurde zum größten Teil von Kühnau (50) übernommen. Um für alle Seren konstante Bedingungen zu schaffen, haben wir die Blutentnahmen in konstantem Abstand zur Insulininjektion, in der Regel zwei bis drei Stunden danach, durchgeführt. Das Serum wurde eine halbe Stunde nach der Blutentnahme abzentrifugiert und bis zur Bestimmung bei -20°C tiefgefroren. Nach Untersuchungen von Kerp und Mitarbeitern (58) bleibt bei Aufbewahrung von tiefgefrorenen Seren die Insulinbindungskapazität während eines halben Jahres konstant.

Reagenzien:

125-markiertes Rinderinsulin (Novo-Industrie).

Die spezifische Aktivität lag zwischen 6,3 und 11,5 mc/mg.

Phosphatpuffer 0,04 molar, pH 8,0

a) 5,444 g/l KH_2PO_4

b) 14,314 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

55 Teile a) und 945 Teile b)

Rinderalbumin trocken "reinst" Behringwerke

Jodacetamid reinst (Serva, Heidelberg), umkristallisiert durch dreimaliges Erwärmen und Abkühlen in destilliertem Wasser mit zwischenzeitlichem Wasserwechsel.

Hochgereinigtes, zehnmal umkristallisiertes Rinderinsulin (Novo-Industrie)

Zellulosepulver MN 100 (Macherey & Nagel, Düren)

Sephadex G 50 fine

Bromphenolblau "Merck".

Das markierte Insulin wurde 24 Stunden vor Gebrauch von unspezifischer Radioaktivität gereinigt.

Zu 0,1 ml Normalserum und 0,2 ml einer einprozentigen Bromphenolblaulösung wurden 0,2 ml (= 20 mc) der verdünnten Radioinsulinstammlösung gegeben. Die Stammlösung war mit dem Phosphatpuffer, enthaltend 0,25% Rinderalbumin und 10 mg% Jodacetamid auf 10 ml aufgefüllt. Der Albuminzusatz verhindert die Adsorption des Insulins an Glas (60). Das Jodacetamid schützt vor mikrobakteriellen Verunreinigungen.

Der größte Teil des nicht an intakte Insulinmoleküle gebundenen radioaktiven Jods lagert sich rasch an die Serumproteine an und läßt sich so als unspezifische Radioaktivität durch Gelfiltration abtrennen.

Das Gemisch wurde auf eine 50 ml fassende Säule, 27 cm hoch, gegeben. Diese Säule hat ein geringes Totvolumen (Pharmacia Upsala, Schweden), sie enthielt 6,0 g Sephadex in Phosphatpuffer. Je fünfzehn Tropfen wurden in mindestens 40 Reagenzgläsern aufgefangen, die Messung der Radioaktivität erfolgte im Autogamma Spectrometer von Packard. Die Radioaktivitätsverteilungskurve zeigt drei deutlich von einander abgesetzte Gipfel (50). Die maximale Ra-

dioaktivität des hohen mittleren Gipfels wurde zusammengefaßt und für die Versuche verwendet. Diese Fraktion charakterisiert sich durch ihr immunologisches Verhalten und durch ihre biologische Wirksamkeit als Insulin (50,11).

Das nicht markierte, zehnmal umkristallisierte Rinderinsulin ($40 \mu\text{g} = 1 \text{ Einheit}$) wurde in $n/300$ Salzsäure gelöst und zunächst mit dem oben genannten Phosphat-Albumin-Jodacetamidpuffer auf die Verdünnung von $10^6 \mu\text{E/ml}$ gebracht. Aus dieser Stammlösung wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt. Die Bestimmungsansätze wurden in dem gleichen Puffer achtfach vorbereitet, nämlich in Anwesenheit von 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$, $10^5 \mu\text{E/ml}$.

Es wurden immer Doppelwerte gemessen, um den methodischen Fehler möglichst klein zu halten.

Nur wenn sich eine sehr hohe Insulinbindung ergab, wurde die Untersuchung mit

5×10^5 , $7,5 \times 10^5$, $10^6 \mu\text{E/ml}$

nichtmarkierten Insulins pro Ansatz erweitert. Die pro Ansatz zugegebene Radiojodinsulin-Tracerdosis lag bei 10 nc , entsprechend $10\,000$ Impulsen pro Minute bei dem Wirkungsgrad des Zählgerätes von ca. 40% .

Der Einzelansatz besteht aus $1,8 \text{ ml}$ Phosphat-Albumin-Jodacetamidpuffer, enthaltend das markierte und das unmarkierte Insulin. Dazu wurden $0,2 \text{ ml}$ Probandenserum gegeben, das nun bei dem Gesamtvolumen des Ansatzes von $2,0 \text{ ml}$ auf $1:10$ verdünnt ist. Nach Umschütteln inkubierte das Gemisch 48 Stunden bei 4°C . Erst nach dieser Zeit ist die maximale Bindung des zugesetzten Insulins eingetreten. Dann wurden nach Radioaktivitätsmessung 200 mg Zellulosepulver zugegeben und die Ansatzröhrchen fünf Minuten in einer Schüt-

telapparatur geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der festen Phase wurde die Radioaktivität von 1,0 ml abpipettiertem Überstand gemessen. Das Zellulosepulver diente zur Abtrennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin.

Sowohl von der halbierten Gesamtimpulszahl, als auch von der des Überstandes ist der Blindwert (Leerwert des Gerätes und Aktivität eines Kontrollansatzes ohne Jodinsulin) abzuziehen (50). Die Menge des an antikörpergebundenen Insulins ergibt sich aus dem Verhältnis des halbierten Zählwerts der Gesamtaktivität zur Zählausbeute des Überstands.

Mathematische Auswertung der erhaltenen Meßpunkte

Zuerst wurde versucht, aus den Meßergebnissen und dem von Berson und Yalow (56) für die Insulinantikörperbestimmung eingeführten Koordinatensystem nach Scatchard (57) die maximale Insulinbindungskapazität graphisch zu ermitteln. Es zeigte sich jedoch, daß bei dieser Methode die Fehlerbreite bis zu 50% der Gesamtbindungskapazität betrug. Deshalb wurde nach einem einfachen mathematischen Verfahren gesucht, um die maximale Insulinbindungskapazität im Rahmen der Meßgenauigkeit mit kleinst möglichen Fehler zu ermitteln.

Als Grundlage für die mathematische Bestimmung diente das Massenwirkungsgesetz, das der Reaktion von Insulin und Insulinantikörper zu Grunde liegt (56).

$$1 \quad K = \frac{[AgAk]}{[Ag][Ak]}$$

wobei $AgAk$ die Konzentration des Antigen- Antikörperkomplexes, Ag die Konzentration des freien Antigens und Ak die Konzentration der freien Insulinbindungsstellen des Antikörpers bedeuten. Außerdem gilt:

$$2 \quad [Ak_{ges}] = [Ak] + [AgAk]$$

da Ak_{ges} die molare Konzentration aller vorhandenen Insulinbindungsstellen bezeichnet.

Bei Einsetzen von Gleichung (2) in Gleichung (1) folgt daraus:

$$3 \quad K = \frac{[AgAk]}{[Ag]([Ak] - [AgAk])}$$

Aufgelöst nach $AgAk$ erhält man:

$$4 \quad AgAk = \frac{K \cdot Ak \cdot J}{1 + K \cdot J} = \frac{Ak \cdot J}{\frac{1}{K} + J} \quad (K \neq 0!)$$

Für den Fall, daß mehrere Bindungsstellen vorliegen (57) gilt:

$$5 \quad AgAk = AgAk_1 + \dots + AgAk_e = \frac{Ak_1 \cdot J}{\frac{1}{K_1} + J} + \dots + \frac{Ak_e \cdot J}{\frac{1}{K_e} + J}$$

Setzt man die allgemein üblichen Bezeichnungen für antikörpergebundenes Insulin = B und für freies Insulin = F ein, so kann man die Gleichung (5) umändern in:

$$6 \quad \frac{B}{F} = \frac{Ak_1}{\frac{1}{K_1} + F} + \dots + \frac{Ak_e}{\frac{1}{K_e} + F}$$

Setzt man $y = B/F$ und $x = F$, so folgt:

$$7 \quad y(x) = \frac{Ak_1}{\frac{1}{K_1} + x} + \dots + \frac{Ak_e}{\frac{1}{K_e} + x}$$

Die gemessenen n Wertepaare (x_i, y_i) ($i = 1, \dots, n$) hat man mit der Funktion aus Gleichung (7) möglichst genau zu bestimmen, d.h. man versucht nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einer Geraden auszugleichen.

Man bestimmt die Parameter in Gleichung (7) derart, daß die Summe minimal wird:

$$8 \quad Z = \sum_{i=1}^n \left(1 - \frac{y(x_i)}{y_i} \right)^2$$

Z aus Gleichung (8) ist eine Funktion der Parameter Ak_1 bis Ak_n und $1/K_1$ bis $1/K_n$. Aus der notwendigen Bedingung für ein Minimum folgt die partielle Ableitung:

$$9 \quad \frac{\partial Z}{\partial Ak_1} = 0, \dots, \frac{\partial Z}{\partial Ak_e} = 0, \quad \frac{\partial Z}{\partial K_1} = 0, \dots, \frac{\partial Z}{\partial K_e} = 0$$

Es stellt sich jetzt die Frage, wieviele Hyperbeln man in Gleichung (7) berücksichtigen muß. Die Antwort wird außer durch die chemische Theorie auch durch die Genauigkeit der Meßwerte bestimmt. Der relative Meßfehler liegt bei etwa 10%. Ändert sich beim Übergang von n Summanden zu (n+1) der Wert des Minimums in Gleichung (8) nicht mehr, so muß man sich mit n Summanden zufrieden geben. Mit n = 1 beginnend, kann man durch schrittweises Erhöhen von n um 1 den maximalen Wert von n bestimmen.

Bei der Funktion in Gleichung (7) kann noch folgende Schwierigkeit auftreten: sind die gesuchten Werte von Ak_i und $1/K_i$ ($i = 1, \dots, n$) in einem Hyperbelsummanden einige Zehnerpotenzen größer als die auftretenden x_i -Werte, so kann man Zähler und Nenner mit der gleichen Zahl multiplizieren, also Ak_i und $1/K_i$ erheblich ändern, ohne daß sich der Wert des Bruches wesentlich ändert. Diese numerische Instabilität kann man durch Erweiterung jedes Hyperbelsummanden mit seinem reziproken Zähler beheben. Man erhält somit die Gleichung (10) aus der Gleichung (7):

$$y(x) = \frac{1}{\frac{1}{K_1 \cdot Ak_1} + \frac{x}{Ak_1}} + \dots + \frac{1}{\frac{1}{K_e \cdot Ak_e} + \frac{x}{Ak_e}}$$

Zur Abkürzung führt man die neuen Parameter ein:

$a_i = 1/Ak_i$ und $c_i = 1/K_i Ak_i$ ein und erhält:

$$10 \quad y(x) = \frac{1}{a_1 x + c_1} + \dots + \frac{1}{a_e x + c_e}$$

Mit dieser Funktion gleicht man nun nach Gleichung (8) und (9)

aus. Die Größe Z ist die Bezeichnung für den relativen Zwang, aus der sich der mittlere Fehler $(1-y(x_1)/y_1)^2$ (relative Streuung) zu $\sqrt{\frac{Z}{n}}$ berechnet. Die Fehlerquadratsumme unter Zwang beträgt:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - y(x_i))^2$$

Für den Fall $n = 1$:

Der Fall $n = 1$ läßt sich noch über ein lineares Gleichungssystem lösen. Die Gleichung (10) hat die Form:

$$11 \quad y(x) = \frac{1}{a_1 x + c_1}$$

Man geht zur reziproken Funktion $u(x) = 1/y(x)$ über, also

$$12 \quad u(x) = ax + c \quad (a = a_1, \quad c = c_1)$$

und benutzt die Gleichung (8) und (9) ($u_i = 1/y_i$, ($i = 1, \dots, n$)):

$$13 \quad Z' = \sum_{i=1}^n -\left(1 - \frac{ax_i + c}{u_i}\right)^2 = \text{minimal}$$

$$0 = \frac{\partial Z'}{\partial c} = \sum_{i=1}^n -2\left(1 - \frac{ax_i + c}{u_i}\right) \frac{1}{u_i}, \quad 0 = \frac{\partial Z'}{\partial a} = \sum_{i=1}^n -2\left(1 - \frac{ax_i + c}{u_i}\right) \frac{x_i}{u_i}$$

Daraus folgt

$$a \sum_i \frac{x_i}{u_i^2} + c \sum_i \frac{1}{u_i^2} = \sum_i \frac{1}{u_i} \quad a \sum_i \left(\frac{x_i}{u_i}\right)^2 + c \sum_i \frac{x_i}{u_i^2} = \sum_i \frac{x_i}{u_i}$$

$$\text{Oder mit } u_i = 1/y_i: \quad \begin{cases} a \sum_i x_i y_i^2 + c \sum_i y_i^2 = \sum_i y_i \\ a \sum_i x_i^2 y_i^2 + c \sum_i x_i y_i^2 = \sum_i x_i y_i \end{cases}$$

14

Die Gleichung (14) stellt ein lineares Gleichungssystem zur Berechnung von a und c dar:

$$a = \frac{(\sum x_i y_i^2)(\sum y_i) - (\sum y_i^2)(\sum x_i y_i)}{(\sum x_i y_i^2)^2 - (\sum y_i^2)(\sum x_i^2 y_i^2)}$$

$$(Ak_1 = Ak_{ges.} = \frac{1}{a})$$

$$c = \frac{\sum x_i y_i - a \sum x_i^2 y_i^2}{\sum x_i y_i^2}$$

Sind a und c größer Null, so hat man eine Lösung gefunden.

Für den Fall $n = 2$:

In diesem Fall kann man sich noch über ein lineares Gleichungssystem einen guten Startwert für eine Iteration zur Lösung des Ausgleichsproblems der Gleichungen (7), (8) und (9) verschaffen. Dazu braucht man die Funktion in der Form der Gleichung (7). Mit den Abkürzungen

$a = Ak_1$, $b = Ak_2$, $c = 1/K_1$ und $d = 1/K_2$ wird:

$$15 \quad y(x) = \frac{a}{x+c} + \frac{b}{x+d}$$

Man multipliziert die Gleichung (15) mit $(x+c)(x+d)$ und erhält: $y(c+x)(d+x) = a(x+d) + b(x+c)$

$$\text{oder } 0 = (a+b)x^2 - (c+d)xy + (ad+bc)x - cdy - yx^2$$

Mit $(a+b) = p_1$, $(c+d) = p_2$, $(ad+bc) = p_3$, $cd = p_4$, und $f_1(x,y) = x^2$, $f_2(x,y) = -xy$, $f_3(x,y) = x$, $f_4(x,y) = -y$ und $f_5(x,y) = -yx^2$ wird daraus:

$$16 \quad \sum_{k=1}^4 (p_k f_k(x,y)) - f_5(x,y) = 0$$

Nun sollten alle Meßwerte (x_i, y_i) diese Gleichung bei geeigneter Wahl der p_k erfüllen. Für eine Wahl der p_k wird das aber nur bis auf einen Rest r_i möglich sein:

$$17 \quad \sum_{k=1}^4 (p_k f_k(x_i, y_i)) - f_5(x_i, y_i) = r_i \quad (n > 4)$$

Man wird also die p_k so wählen, daß die Reste r_i möglichst klein

werden, d.h. etwa die Restequadratsumme minimal wird:

$$18 \quad R = \sum_{i=1}^n r_i^2 = \text{minimal}$$

$$\text{nun ist } R = \sum_i r_i^2 = \sum_{i=1}^n \left(\sum_{k=1}^4 p_k f_k(x_i, y_i) - f_5(x_i, y_i) \right)^2 = \text{minimal}$$

Man differenziert wieder partiell nach p_K :

$$\frac{\partial R}{\partial p_j} = \sum_{i=1}^n \left[2 \left(\sum_{k=1}^4 p_k f_k(x_i, y_i) - f_5(x_i, y_i) \right) f_j(x_i, y_i) \right] = 0 \quad (j = 1, \dots, 4)$$

oder

$$19 \quad \sum_{k=1}^4 p_k \left(\sum_{i=1}^n f_k(x_i, y_i) f_j(x_i, y_i) \right) = \sum_{i=1}^n f_5(x_i, y_i) f_j(x_i, y_i)$$

Bezeichnet man mit

$$a_{jk} = \sum_{i=1}^n f_j(x_i, y_i) f_k(x_i, y_i) \text{ mit } jk = 1, \dots, 4 \text{ und}$$

$$20 \quad b_j = \sum_{i=1}^n f_5(x_i, y_i) f_j(x_i, y_i) \text{ mit } j = 1, \dots, 4$$

so erhält man das lineare Gleichungssystem zur Berechnung der p_K :

$$21 \quad \sum_{k=1}^4 a_{jk} p_k = b_j$$

$$\text{oder } \begin{matrix} a_{11} p_1 + a_{12} p_2 + a_{13} p_3 + a_{14} p_4 = b_1 \\ \vdots \\ a_{41} p_1 + a_{42} p_2 + a_{43} p_3 + a_{44} p_4 = b_4 \end{matrix}$$

Dieses Gleichungssystem muß man nun lösen (Gauß-Eliminationsverfahren) und falls alle p_1 bis p_4 größer Null sind, hat man eine Lösung gefunden.

Nach diesem Verfahren hat sich gezeigt, daß die vorliegenden Meßwerte für A_{k1} Werte lieferten, die 1 bis 10% des Wertes von A_{k2} betragen.

Die vorhandenen Meßwerte wurden bereits durch eine Hyperbel ($n = 1$) bestmöglich ausgeglichen, d.h. es konnte nur ein $A_{k_{ges}}$ zuverlässig bestimmt werden.

IV. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle I bis III zusammengefaßt.

In der Tabelle I wurde die ~~maximale~~ Insulinbindungs-kapazität an 181 Diabetikerseren bestimmt. Es wurde untersucht, ob eine exponentielle Abhängigkeit der Bindungs-kapazität zum täglichen Insulinbedarf vorliegt. Dabei ergibt sich eine Regressionsgerade, welche durch den Korrelationskoeffizienten belegt werden kann.

Der Korrelationskoeffizient $r = 0,37627$ bei einer Konfidenz von 95%.

Der Prüfquotient $= 0,67220$

Die Signifikanzschranke $F = (17; 166) = 1,69$

Der Prüfquotient ist kleiner als die Signifikanzschranke, deshalb muß eine lineare Regression angenommen werden.

Die Prüfung des Regressionskoeffizienten gegen Null verläuft positiv, d.h. die Prüfgröße ist signifikant unterschiedlich von Null.

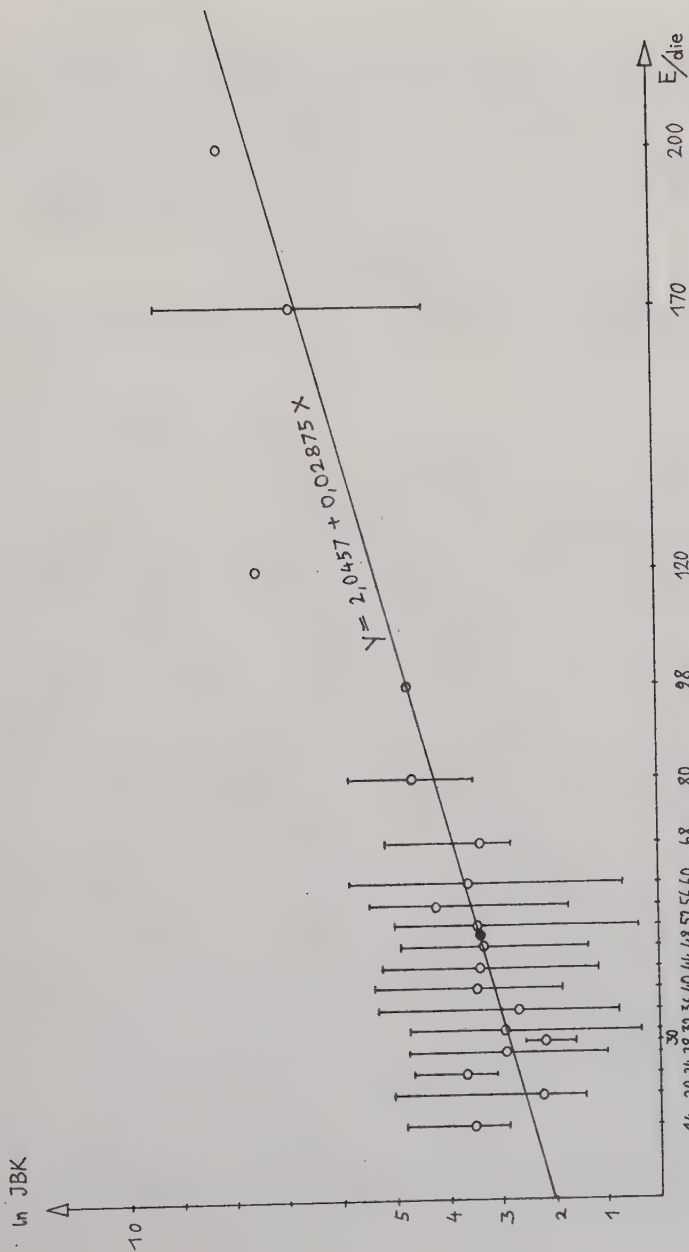


Abb. 1.: Maximale Insulinbindungskapazität und täglicher Insulinbedarf (I4 bis 200 E) bei 181 Diabetikern. Die Kreise stellen die Spaltenmittelwerte dar. Der Masstab ist semilogarithmisch.

In der Tabelle II wurde an 225 Diabetikerseren untersucht, ob eine lineare Abhängigkeit der maximalen Insulinbindungskapazität zum täglichen Insulinbedarf vorliegt. Dabei konnte bis zu einem täglichen Insulinbedarf von 98 Einheiten eine Abhängigkeit gefunden werden. Es handelt sich dabei aber um eine Scheinregression, die durch den Korrelationskoeffizienten nicht belegt werden kann.

$r = 0,17334$ bei einer Konfidenz von 95%.

Der Prüfquotient $= 1,19630$

$F = (14; 204) = 1,74$

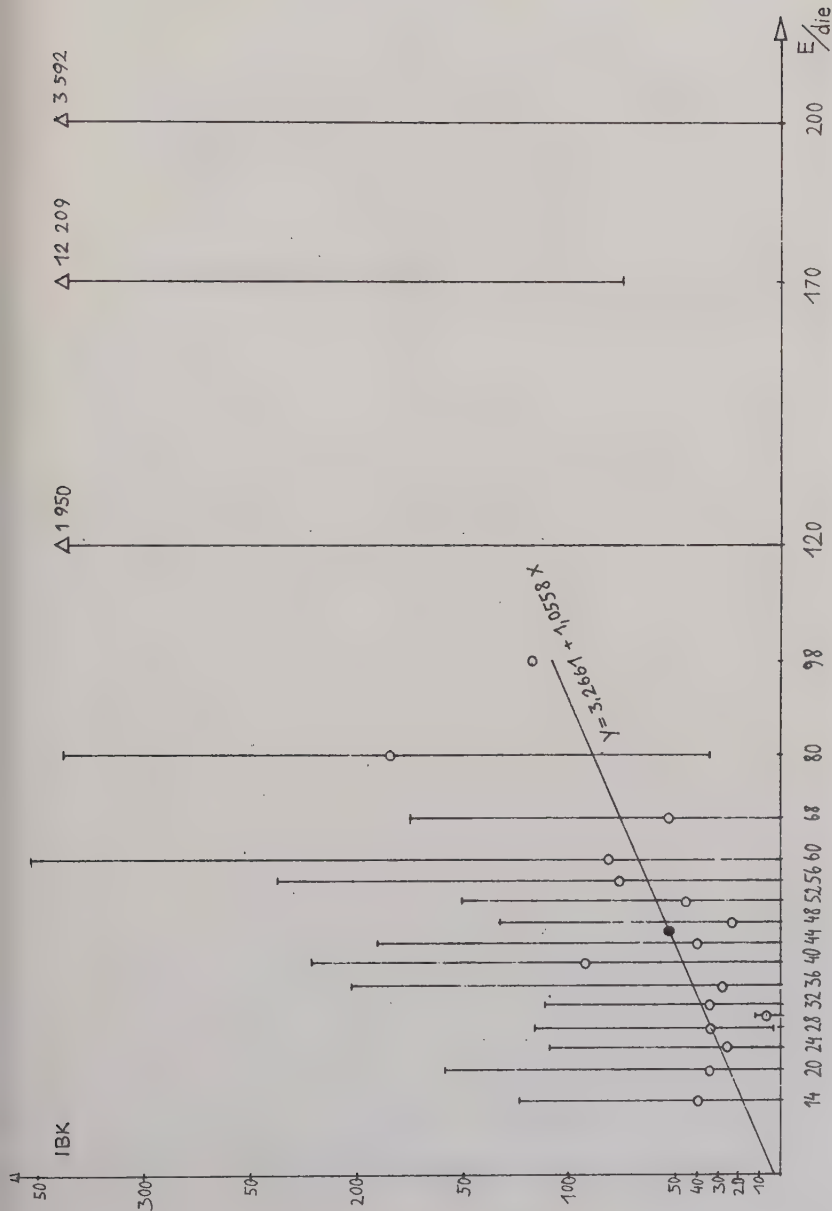


Abb. 1.1.: Maximale Insulinbindungskapazität und täglicher Insulinbedarf (14-98 E) bei 225 Diabetikern. Die Kreise stellen jeweils die Spaltenmittelwerte dar.

In der Tabelle III wurde an 167 Diabetikerseren untersucht, ob eine Beziehung der maximalen Insulinbindungskapazität zur Dauer der Insulintherapie vorliegt.

Eine lineare Abhängigkeit muß verneint werden, eine exponentielle Abhängigkeit kann jedoch angenommen werden, d.h. daß mit Zunahme der Dauer der Insulintherapie die maximale Insulinbindungskapazität abnimmt.

$r = - 0,18650$, bei einer Konfidenz von 95%.

Diese Frage wurde an Patienten geprüft, die mindestens ein Jahr lang Insulin erhalten hatten.

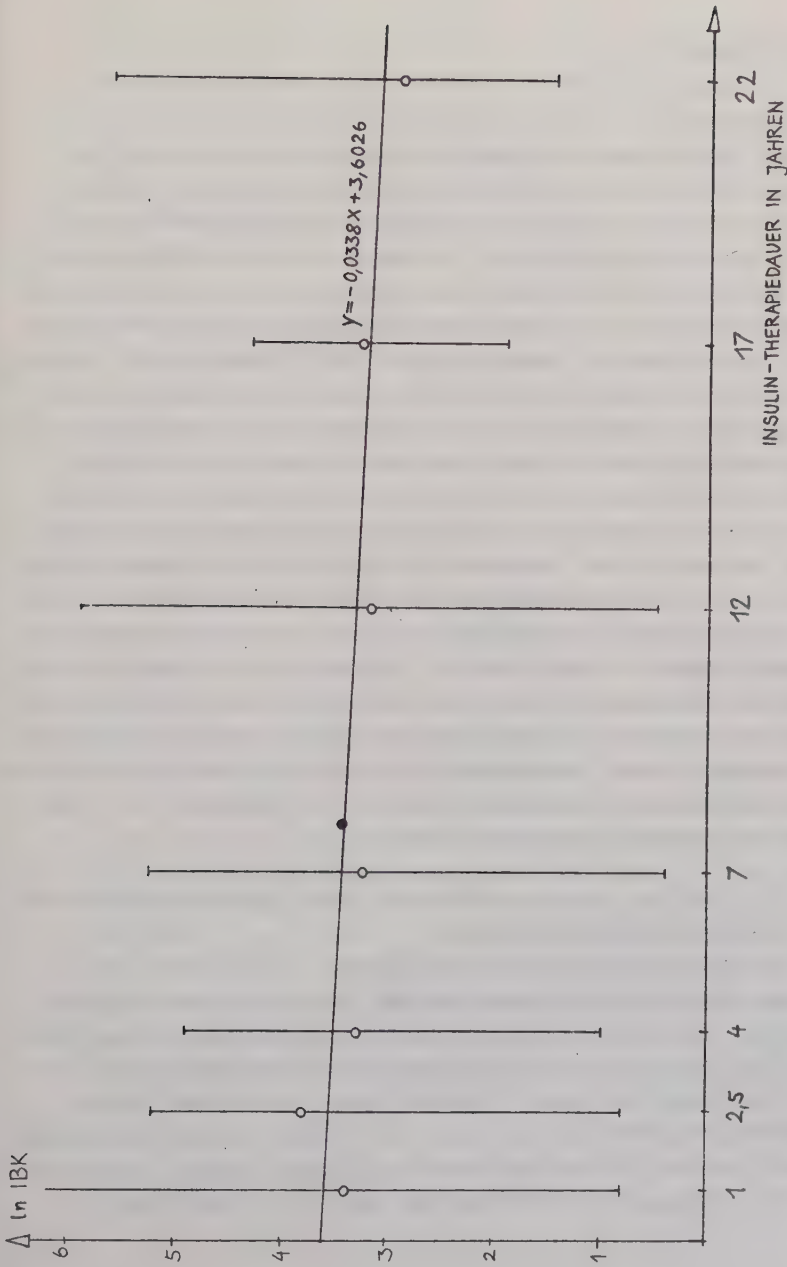


Abb. 111: Beziehung zwischen maximaler Insulinbindungskapazität und Dauer der Insulintherapie bei 167 Diabetikern. Minimale Therapiedauer ein Jahr.

V. Diskussion

Zur Methodik

Die bisherigen Verfahren zur Ermittlung der maximalen Insulinbindungskapazität beruhten im Wesentlichen darauf, daß die erhaltenen Meßpunkte graphisch ausgewertet wurden. Dabei wurde so vorgegangen, daß das Verhältnis des gebundenen zum freien Insulin bei den verschiedenen Konzentrationen an freiem Insulin in ein Koordinatensystem (57,56) eingesetzt wurde und die maximale Insulinbindungskapazität durch Extrapolation der Kurve durch die erhaltenen Meßpunkte ermittelt wurde. Wir versuchten zunächst unsere Untersuchungen nach der gleichen Methode darzustellen und stellten dabei fest, daß sich aus der graphischen Darstellung mitunter ein Fehler bis zu 50% ergab. Wir haben daher nach einem einfachen mathematischen Verfahren gesucht, um solch grobe Extrapolationsfehler zu vermeiden. Mit Hilfe dieser Methode kann die maximale Insulinbindungskapazität mit einem kleinst möglichen Fehler bestimmt werden. Es handelt sich dabei um ein lineares Gleichungssystem, das aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet wurde. Die Einzelheiten und die Ableitung sind in der Methode genau geschildert. Wir sind der Ansicht, daß diesem Verfahren in jedem Falle der Vorzug gegenüber der graphischen Auswertung gegeben werden muß.

Zur Korrelation zwischen maximaler Insulinbindungskapazität und täglichem Insulinbedarf

Die Beziehungen zwischen täglichem Insulinbedarf und der maximalen Insulinbindungskapazität, wie sie andere Autoren fanden (18,61,50,58), konnten bestätigt werden. Bei Auftragung des Logarithmus der maximalen Bindungskapazität in das Koordinatensystem (Abb.I) ergibt sich eine Gerade. Diese Regressionsgerade konnte durch den Korrelationskoeffizienten belegt werden. Es besteht daher eine signifikante exponentielle Abhängigkeit zwischen dem täglichen Insulinbedarf

und der maximalen Insulinbindungskapazität.

Diese Untersuchungen wurden an einem Patientengut durchgeführt, das hinsichtlich seiner Zweiterkrankungen und anderen Ursachen der Insulinunterempfindlichkeit nicht streng selektiert wurde. Es wurde also in der Statistik nicht mit berücksichtigt, ob ein Infekt, eine Lebererkrankung, eine Hyperlipidämie oder eine endokrine Erkrankung vorlagen. Aus diesem Grunde ist es nicht erstaunlich, daß bei der statistischen Auswertung die Einzelwerte eine relativ große Streuung um die Spaltenmittelwerte aufweisen. Da sich jedoch trotz dieser Vernachlässigung statistisch eine signifikante Abhängigkeit des Insulinbedarfs von der maximalen Insulinbindungskapazität ergab, ist anzunehmen, daß die verschiedenen Faktoren wahrscheinlich in ihren Auswirkungen auf den Insulinbedarf eine untergeordnete Rolle, verglichen mit der Bedeutung der Insulinantikörper, haben.

Wir fanden außerdem, daß eine lineare Abhängigkeit bis zu einem täglichen Insulinbedarf von 98 Einheiten vorlag (Abb.II). Dabei handelte es sich allerdings um eine Scheinregression, die durch den Korrelationskoeffizienten nicht belegt werden kann. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die maximale Bindungskapazität bei einem geringeren täglichen Insulinbedarf eine annähernd lineare Beziehung zum Insulinbedarf aufweist. Die Größe von Ak_1 betrug in unseren Versuchen 0,1 bis 10% der maximalen Bindungskapazität. Dasselbe fanden Kühnau (50) und insbesondere Kerp (58). Die Größe von Ak_1 liegt jedoch innerhalb der durch die Meßmethode verursachten Fehlerbreite von 10%, so daß keine sichere Aussage über das Vorhandensein und die Größe einer Bindungsstelle Ak_1 gemacht werden kann. Aus diesem Grunde und vor allem weil bei der graphischen Auswertung der erhaltenen Meßpunkte die Irrtumswahrscheinlich-

keit für die Größe von Ak_1 , ein mehrfaches seiner Größe betragen kann, haben wir im Gegensatz zu Kerp und anderen Autoren (56,18,54) darauf verzichtet eine Korrelation zwischen der Bindungsstelle Ak_1 und dem Insulinbedarf zu suchen. Unserer Meinung nach kann nur eine gesamte maximale Bindungskapazität mit Sicherheit annähernd genau bestimmt werden.

Zur Korrelation zwischen maximaler Insulinbindungskapazität und der Dauer der Insulintherapie

Die Frage, ob eine Korrelation der maximalen Insulinbindungskapazität zur Dauer der Insulintherapie vorliegt, wurde an Patienten geprüft, die mindestens ein Jahr lang Insulin spritzten. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit nicht nachgewiesen werden. Dagegen fanden wir eine exponentielle Abhängigkeit der maximalen Insulinbindungskapazität zur Dauer der Insulintherapie dahingehend, daß mit der Zunahme der Dauer der Insulintherapie die maximale Bindungskapazität abnimmt. Dieses Ergebnis überrascht zunächst: man könnte eher vermuten, daß es im Laufe der Insulintherapie zu einer ständig sich verstärkenden Bildung von Insulinantikörpern kommt. Nach unseren Untersuchungen an einem sehr großen Patientengut, scheint es jedoch so zu sein, daß trotz jahrelanger Insulintherapie im Laufe der Zeit die Bildung von Insulinantikörpern eher abnimmt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungsergebnissen von Deckert und Kühnau (48,50), die einen Anstieg der Konzentration zirkulierender Antikörper in Abhängigkeit von der Dauer der Insulintherapie nicht beobachten konnten. Eine Abnahme der Konzentration zirkulierender Antikörper im Laufe einer längerer Insulintherapie wird von Kühnau und Deckert (48,50) nicht diskutiert. Immerhin glauben wir, aus dem Befund schließen zu dürfen,

daß hinsichtlich der divergierenden Ergebnisse der genannten Autoren und unserer Resultate, die Länge der Insulintherapie keine wesentliche Rolle bei der Bildung von Insulinantikörpern spielt. Vielmehr dürfte in einzelnen Fällen eine aus bekannten (Infekte usw.) oder unbekannten Gründen bestehende Tendenz zur Antikörperbildung entscheidend für die Größe des Antikörpertiters sein, es läßt sich auch tatsächlich in einzelnen Fällen mit kurzer Diabetesdauer immerwieder ein außerordentlich hoher Antikörpertiter belegen. Auch die Spontanschwankungen des Insulinantikörpertiters, unabhängig von der Länge der Hormonbehandlung, sprechen dafür, daß die Dauer der Insulintherapie nicht unbedingt einen Einfluß auf die Höhe des Antikörpertiters hat.

VI. Zusammenfassung

Es wurde ein neues mathematisches Verfahren zur Berechnung der maximalen Insulinbindungskapazität angewandt. Mit Hilfe dieser Methode konnte der willkürliche Fehler bei der graphischen Ermittlung der maximalen Bindungskapazität ausgeschlossen werden. Wir konnten eine Korrelation zwischen maximaler Insulinbindungskapazität und dem täglichen Insulinbedarf an einem großen Krankengut finden. Es handelt sich um eine exponentielle Abhängigkeit, d.h. je höher der tägliche Insulinbedarf ist, desto mehr steigt die maximale Bindungskapazität an. Die Beziehung der beiden Antikörperbindungsstellen Ak_1 und Ak_2 zum täglichen Insulinbedarf, wie sie andere Autoren (18,54,56) fanden, konnten wir nicht bestätigen, da es nicht erlaubt ist, eine Korrelation zu einer Größe von Ak_1 zu suchen, wenn dieses Ak_1 einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 100% unterliegt (bei der graphischen Auswertung) bzw. innerhalb der Fehlerbreite der Methode von 10% liegt, da das Ak_1 selbst nur 10% der maximalen Bindungskapazität beträgt.

Wir konnten außerdem eine Beziehung der maximalen Bindungskapazität zur Dauer der Insulintherapie finden. Es handelt sich um eine exponentielle Abhängigkeit; die maximale Bindungskapazität nimmt mit der Dauer der Insulintherapie ab. Da andere Autoren (48,50) einen Anstieg der maximalen Bindungskapazität mit der Zunahme der Dauer der Insulintherapie diskutieren, sprechen also die Ergebnisse letztlich eher dafür, daß die maximale Bindungskapazität von der Dauer der Insulintherapie nicht abhängig ist, bzw. offenbar nicht ansteigen dürfte.

1. HANSEN, K. und H.D.EYER: Klinische Studien über allergische Krankheiten. V. Insulinallergie. Dtsch. Arch. Klin. Med. 174, 133 (1933)
2. SCHIRREN, C.G.: Ein ungewöhnlicher Fall von lokaler Insulinanaphylaxie. Hautarzt 4, 531 (1953)
- und H.SAUER: Zur Frage der Insulinallergie. Ärztl. Forschg. 10, 175 (1956)
3. TUFT, L.: Insulin Hypersensitiveness; Immunologic considerations on case reports. Amer. J. Med. Sci. 176 (1928)
4. MORCOS, R.H., S.ABD; E.NABY, H.DITSCHUNEIT und E.F.PFEIFFER: Über die Ursache der Insulinresistenz bei der Insulinschocktherapie in der Psychiatrie. Med. Klin. 60, 1073 (1965)
5. BANTING, F.G., W.R.FRANKS and S.GAIRNS: Anti-insulinactivity of serum of insulin treated patient. Amer. J. Psychiat. 95, 562 (1938)
6. ARMIN, J., R.T.GRANT u. P.H.WRIGHT: Acute insulin deficiency provoked by single injections of antiinsulin serum. J. Physiol. 153, 131-145 (1960)
7. LOGOTHETOPOULOS, J. u. E.G.BELL: Histological and autoradiographic studies of the islets of mice injected with insulin antibody. Diabetes 15, 205-211 (1966)
8. MOLONEY, P.J. u. N.COVAL: Antigenicity of insulin: diabetes induced by specific antibodies. Biochem. J. 59, 179-185 (1955)
9. BRUNFELDT, K. u. T.DECKERT: The antigenic properties of pig insulin. Acta endocrinol. 47, 353-366 (1964)
10. PFEIFFER, E.F.: Halb- und vollsynthetische Insuline. Dtsch. Med. Wschr. 89, 755-757 (1964)
11. KERP, L.: Insulinbindende Antikörper, experimentelle und klinische Untersuchungen. In: Verh. Dtsch. Ges. Allergie- und Immunitätsforschung. X.Kongress, Bd. II, (1966)
Stuttgart: Schattauer (1968)

12. KERP, L., S. STEINHILBER, F. KIELING u. W. CREUTZFELDT:
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Insulin-
allergie und Insulinresistenz. Dtsch. Med. Wschr. 90,
806-814 (1965)
13. FEDERLIN, K., G. HEINEMANN, I. GIGLI u. H. DITSCHUNEIT: Anti-
genbindung durch zirkulierende Leukozyten bei der verzö-
gerten lokalen Insulinallergie. Dtsch. Med. Wschr. 91,
814-819 (1966)
14. BERTSON, S. A., u. R. S. YALOW: Ethanol fractionation of plas-
ma and electrophoretic identification of insulin-binding
antibody. J. Clin. Invest. 36. 642-647 (1957)
15. YAGI, Y., P. MAIER, D. PRESSMAN, C. E. ARBESMANN, R. E. REIS-
MAN u. A. R. LENZNER: Multiplicity of insulin binding anti-
bodies in human sera. J. Immunol. 90, 760-769 (1963)
16. YAGI, Y., P. MAIER, D. PRESSMAN: Antibodies against the com-
ponent polypeptide chains of bovine insulin. Science 147,
617-619 (1965)
17. ENGBRING, N. H., J. A. ARKINS u. E. J. LENNON: Insulin allergy
and insulin resistance. J. Allergy 33, 62-68 (1962)
18. DITSCHUNEIT, H. u. K. FEDERLIN: Beitrag zur Pathogenese der
Insulinresistenz. Dtsch. Med. Wschr. 91, 853-859 (1966)
19. BERTSON, S. A. u. R. S. YALOW: Species-specificity of human anti-
beef, pork insulin serum. J. Clin. Invest. 38, 2017 -
2025 (1959)
20. WILSON, S., G. H. DIXON u. A. C. WARDLAW: Resynthesis of cod
insulin from its polypeptide chains and preparation of
cod-oy "hybrid" insulins. Biochem. J. 71, 633-638 (1959)
21. BERTSON, W. A. u. R. S. YALOW: Insulin in blood and insulin
antibodies. Amer. J. Med. 40, 676-690 (1966)
22. ARQUILLA, E. R., Ph. D. WILLIAM, W. BROMER, D. MERCOLA: Immuno-
logy conformation and biological activity of insulin. Dia-
betes, Vol. 18, No. 4 (1969)

23. BERSON, S.A. u. R.S. YALOW: The present status of insulin antagonists in plasma. *Diabetes* 13, 247-259 (1964)
24. LOCKWOOD, D.H. u. T.E. PROUT: Antigenicity of heterologous and homologous insulin. *Metabolism* 14, 530-538 (1965)
25. RENOLD, A.E., J. STEINKE u. J.S. SOELNER: Immunologic studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow. *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. The aetiology of diabetes mellitus and its complications.* London, Churchill (1964)
26. FENTON, E.L., C.B. MANN, C.G. POPE u. G.H. SMITH: Ann. Meet. Brit. Diabetic. Assoc. (1936) zit. n. 18
27. LOWELL, F.G.: Evidence for the existence of two antibodies for crystalline insulin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 50, 167-172 (1942)
28. YAGI, Y., P. MAIER and D. PRESSMAN: Two different anti-insulin antibodies in guinea pig antisera. *J. Immunol.* 89, 442 (1962)
29. YALOW, R.S. and S.A. BERSON: Immunologic aspects of insulin. *Amer. J. Med.* 31, 882 (1961)
30. TALMAGE, D.W. and J.R. CANN: The chemistry of immunity, Thomas - Springfield, I 11, (1961)
31. MITZKAT, H.J. 18. Dtsch. Kongr. ärzt. Fortbildg., Berlin, Juni 1969 *Praxis Kurier* Nr. 44 (1969)
32. LEWIS, J.H.: The antigenic properties of insulin. *J. Amer. Med. Ass.* 108, 1336 (1937)
33. OAKLEY, G.W.: Advances in the treatment of diabetes mellitus. *Practitioner* 183, 478 (1959)
34. PFEIFFER, E.F. and H. DITSCHUNEIT: Aktuelle Probleme der Diabetestherapie, *Dtsch. Med. Wschr.* 87, 2290 (1962)
35. LERMAN, J.: Insulin resistance. The role of immunity in its production. *Amer. J. Med. Ass.* 207, 354 (1944)

36. JONES, V.E. and A.C.CUNLIFF: A precipitating antibody to insulin. *Nature* 192, 136 (1961)
37. WASSERMANN, P., R.H.BROH-KAHN and I.A.MIRSKY: The antigenic property of insulin. *J. Immunol.* 38 213 (1940)
38. PAV, J., Z.JEZKOVA and F.SKRHA: Insulin antibodies. *Lancet* II, 221 (1963)
39. ARQUILLA, E.R. and A.B.STAVITSKY: Evidence for the insulin dissected specificity of rabbit anti-insulin serum. *J. Clin. Invest.* 35, 467 (1956)
40. STEIGERWALD, D. und W.SPIELMANN: Nachweis von Insulinantikörpern bei Diabetikern mit Insulinresistenz im Hämagglutinationstest und Coombstest. *Klin. Wschr.* 34, 80 (1956)
41. MOINAT, P.: A quantitative estimation of antibodies to exogenous insulin in diabetic subjects. *Diabetes* 7, 462 (1958)
42. BERSON, S.A., R.S.YALOW, A.BAUMAN, M.A.ROTHSCHILD and K.MEWERLY: Insulin-131-I metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.* 35, 170 (1956)
43. WELSH, G.W., E.D.HENLEY, R.H.WILLIAMS and R.S.COX: Insulin-131-I metabolism in man. Plasma binding distribution and degradation. *Amer. J. Med.* 21, 324 (1956)
44. MORSE, J.H.: Rapid production and detection of insulin-binding antibodies in rabbits and guinea-pigs. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 101, 722 (1959)
45. GOLDNER, M.G. and H.G. RICKETTS: Insulin allergy: A report of eight cases with generalized symptoms. *J. Clin. Endocr.* 2, 595 (1942)
46. DAVIDSON, J.E. and E.E.EDDLEMAN: Insulin resistance: review of literature and report of a case associated with carcinoma of pancreas. *Arch. Inter. Med.* 86, 727 (1950)

47. BURROWS, B.A., T. PETERS und F.G. LOWELL: Physical binding of insulin by gamma globulins of insulin resistant subjects. *J. Clin. Invest.* 36, 393-397 (1957)
48. DECKERT, T.: Insulin antibodies. Munksgaard, Kopenhagen (1964)
49. CERASI, E., O. HOGEMAN, R. LUFT, J. PORATH und A. ROOVETE: Insulin antibodies: description of specific serum protein localisation in a patient with insulin resistant diabetes. *Diabetologica* 2, 45 (1966)
50. KÜHNAU, J.: Die Bedeutung humoraler Insulinantikörper für die Insulinansprechbarkeit bei Diabetes mellitus und die Konsequenzen für die Therapie. *Habil. Schrift*, Hamburg (1968)
51. FANKHAUSER, S.: Zur Klinik und Therapie der Insulinresistenz. *Praxis* (Bern) 53, 185 (1964)
52. BERSON, S.A., S.M. GLICK and J. ROTH: Immunoassay of proteins and peptide hormones. *Metabolism* 13, 1135 (1964)
53. KERP, L., S. STEINHILBER und H. KASEMIR: Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption. *Klin. Wschr.* 44, 560-567 (1966)
54. ROSSELIN, G., G. TCHOBROUTSKY, R. ASSAN, J. LELLOUCH, J. DO-LAIS und M. DEROT: Etude radioimmunologique de la réaction insuline - anticorps anti- insuline. *Rev. franc. étud. clin. et biol.* 10, 1045-1063 (1965)
55. TAYLOR, K.W.: The effect of human protein fractions in the glucose uptake of the isolated rat diaphragm. *Biochem. J.* 69, 598 (1958)
56. BERSON, S.A. und R.S. Yalow: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulinbinding antibody. *J. Clin. Invest.* 38, 1996-2016 (1959)
57. SCATCHARD, G., J.S. COLEMAN und A.L. SHEN: Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 12-20 (1957)

58. KERP, L., H. KASEMIR und F. KIELING: Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern. Klin. Wschr. 46, 376-385 (1968)
59. MEYER, H.-W.: Über die Bindung von Rinder- und Schweineinsulin durch zirkulierende Antikörper im Serum von Diabetikern. Med. Welt 33/34, 1758-1763 (1968)
60. HILL, J.B.: The adsorption of ^{131}I -insulin to glass. Endocrinology 65, 515 (1959)
61. KERP, L.: Untersuchungen zur klinischen Bedeutung insulinbindender Antikörper. In: Verh. Dtsch. Ges. Allergie- und Immunitätsforschung, IX. Kongress, Bd. I, (1963) Stuttgart: Schattauer (1965).

Herrn Professor Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. K.-H. Dehmel für sein großes Interesse und seine tatkräftige Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. O. Wieland, daß er mir die Möglichkeit gab meine Untersuchungen an seinem Institut durchzuführen. Herrn Oberphysikrat Dr. Czempel und Herrn Dr. Henftling (ärztlicher Leiter der Isotopen-Abteilung des Krankenhauses München Schwabing) bin ich für die Erlaubnis dort arbeiten zu dürfen zu Dank verpflichtet.

Herrn Dipl.-Math. Dr. E. Jörn danke ich für die mathematische Auswertung meiner Ergebnisse.

VIII. Lebenslauf

Am 19. März 1943 wurde ich als Tochter des Landwirts Johann Tyroller und seiner Frau Eleonore, geborene Schmautz, in Ried geboren.

Von 1949 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Schrobenhausen und von 1957 bis 1959 die landwirtschaftliche Berufsschule in Schrobenhausen. 1959 trat ich in das Deutsche Gymnasium der Franziskanerinnen in Dillingen a.d. Donau über, wo ich 1965 das Reifezeugnis erwarb. Nach einem Semester Naturwissenschaften begann ich das Studium der Medizin an der Universität München und bestand dort im Frühjahr 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Herbst 1968 die ärztliche Vorprüfung. Nach elf Studiensemestern beabsichtige ich im Herbst 1971 das medizinische Staatsexamen abzulegen.

